



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE CERA DE ABELHA
CONTENDO RETINOL

PAULINA MARQUES DE OLIVEIRA NETA

SÃO CRISTÓVÃO – SE
SETEMBRO, 2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE CERA DE ABELHA
CONTENDO RETINOL

PAULINA MARQUES DE OLIVEIRA NETA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como
exigência para obtenção do título de Bacharel em
Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Amélia Moreira Lira.

SÃO CRISTÓVÃO – SE

SETEMBRO, 2017

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE CERA DE ABELHA CONTENDO RETINOL

Paulina Marques de Oliveira Neta, Narendra Narain, Marcelo Calvacante Duarte¹ & Ana AméliaMoreira Lira^{1*}

¹ Laboratório de Desenvolvimento Farmacotécnico, Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão – SE, Brasil.

* **Autor correspondente:** Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Sergipe. Av. Marechal Rondon, s/n, Jardim Rosa Elze, São Cristóvão-SE, Brasil. CEP: 49100-000.

Tel.: +55 79 21056600

E-mail: ana_lira2@hotmail.com

26 RESUMO

27

28 O retinol, derivado da vitamina A, é um ativo cosmético muito usado em tratamento
29 antienvhecimento da pele. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi obter nanopartículas lipídicas
30 (NL) contendo acetato de retinol para uso cosmético. As NL foram obtidas através do método de
31 difusão de solvente em fase aquosa, utilizando apenas cera de abelha como matriz lipídica (NLS) ou
32 incorporar esqualeno como lipídio líquido (CLN). O tamanho das partículas, índice de
33 polidispersividade, potencial zeta e eficiência de encapsulação das amostras foram determinados. O
34 estudo de liberação *in vitro* foi também realizado utilizando células de difusão tipo *Franz*. Como
35 resultados, todas as amostras apresentaram tamanho nanométrico entre 143 e 774 nm, IPD máximo
36 de 0,340 e PZ elevado. A EE obtida foi de 99,95% e 100% para as NL obtidas. As NL foram
37 capazes de incorporar eficientemente o acetato de retinol. Carreadores contendo esqualeno na
38 matriz lipídica apresentaram melhores resultados, com tamanho menor e distribuição de tamanho
39 mais uniforme, além de um PZ acima de $|30|$ mV. Estes carreadores apresentaram perfil de
40 liberação sustentada durante o período estudado. Assim, concluímos que nas condições empregadas
41 e avaliadas, os CLN mostraram ser formulações mais promissoras para a veiculação do ativo que as
42 NLS.

43

44

45

46 Palavras-chave: carreadores lipídicos nanoestruturados, nanopartículas lipídicas sólidas, acetato de
47 retinol.

48

49

50

51 **ABSTRACT**

52 Retinyl, derived from vitamin A, is a cosmetic active substance widely used in antiaging skin
53 treatment. Thus, the objective of this work was to obtain lipid nanoparticles (NL) containing retinol
54 acetate for cosmetic use. NL were obtained by the solvent diffusion method in the aqueous phase,
55 using only beeswax as a lipid matrix (NLS) or incorporating squalene as liquid lipid (CLN). The
56 particle size, polydispersity index, zeta potential and encapsulation efficiency of the samples were
57 determined. The in vitro release study was also performed using Franz type diffusion cells. As
58 results, all samples had a nanometric size between 143 and 774 nm, maximum IPD of 0.340 and
59 elevated PZ. The EE obtained was 99.95% and 100% for the NL obtained. The NL were able to
60 efficiently incorporate the retinol acetate. Carriers containing squalene in the lipid matrix presented
61 better results, with smaller size and more uniform size distribution, besides a PZ above 30 | mV.
62 These carriers had a sustained release profile during the study period. Thus, we conclude that under
63 the conditions employed and evaluated, CLNs have been shown to be more promising formulations
64 for the delivery of the active than NLS.

65 Keywords: nanostructured lipid carriers, solid lipid nanoparticles, retinol acetate.

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76 1. Introdução

77

78 O retinol, derivado da vitamina A, é um ativo cosmético muito usado em tratamento
79 antienvhecimento da pele para fins cosméticos. O principal efeito da classe dos retinóis é reduzir a
80 aparência visual do envelhecimento da pele e tratar as linhas finas e rugas. Porém, ele sofre
81 processo de degradação oxidativa, é instável na presença de luz e calor e por isso precisa ser
82 estabilizado em formulações que o protejam durante a sua manipulação e armazenamento
83 (CLARES *et al.*, 2014).

84 O Retinol é lipofílico, pouco solúvel em água e pode ser um bom candidato a ser veiculado
85 em lipossomas (LP), nanoemulsões (NE) e nanopartículas lipídicas (NL) com o objetivo de
86 aumentar a sua eficácia e reduzir respostas irritantes a pele, como excesso de vermelhidão,
87 fotossensibilidade e irritação.

88 Sistemas de liberação controlada de fármacos, como as NL atraíram grande interesse de
89 pesquisadores acadêmicos e industriais devido a suas inúmeras vantagens (PHARM, *et al.*, 2013).
90 Os dois principais tipos de NL são as Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) e os Carreadores
91 Lipídicos Nanoestruturados (CLN) (Hu *et al.*, 2008).

92 NLS são mais estáveis que os lipossomas, e comparados com as nanopartículas
93 poliméricas, esses sistemas apresentam menor custo e maior segurança, visto que a sua matriz é
94 composta por lipídios de baixo custo que são fisiologicamente compatíveis, o que diminui o risco
95 potencial de toxicidade aguda e crônica (MEHNERT and MADER, 2001). NLS são produzidas
96 substituindo o lipídio líquido (óleo) de uma emulsão O/A por um lipídio sólido ou uma mistura de
97 lipídios sólidos, ou seja, a matriz lipídica é sólida nas temperaturas ambiente e corporal (LUCKS et
98 al., 1991). A matriz sólida pode proteger o fármaco incorporado contra degradação química e
99 oferecer uma maior flexibilidade na modulação dos perfis de liberação do fármaco (OLBRICH et
100 al., 2001; MÜLLER et al., 1996). Além disso, NLS podem ser usadas com sucesso em várias vias

101 de administração, são obtidas por métodos de fácil transposição, podem carrear fármaco hidrofílicos
102 e lipofílicos, aumentam a absorção de fármacos através de mucosas e da pele, além da possibilidade
103 de direcionamento e liberação controlada de fármacos (MEHNERT and MADER, 2001; MÜLLER
104 *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2006; DATE *et al.*, 2007; SCHAFER-KORTING *et al.*, 2007).

105 Os CLN foram desenvolvidos para transpor desvantagens presentes nas NLS. Estes sistemas
106 são obtidos a partir de misturas entre lipídios sólidos e lipídios plásticos (semi sólidos) ou lipídios
107 líquidos, o que gera imperfeições na estrutura cristalina das nanopartículas, ocasionando a melhora
108 da eficiência de encapsulaçãodo ativo Além disso, os CLN apresentam uma maior capacidade de
109 veiculação de fármacos que as NLS (SOUTO *et al.*, 2004).

110 O tamanho nanométrico garante um contato próximo com o estrato córneo o que pode
111 aumentar a quantidade de ativo que penetra na pele (LV *et al.*, 2009) e, além disso, apresentam
112 propriedades oclusivas que promovem benefícios adicionais como aumento da hidratação da pele
113 (maior que as formulações convencionais) e a promoção da penetração na pele de ativos
114 (PARDEIKE *et al.*, 2009). Por fim, NL são capazes também de melhorar a estabilidade química de
115 produtos sensíveis à oxidação de luz e hidrólise como os retinoides (PARDEIKE *et al.*, 2009;
116 MULLER *et al.*, 2000).De uma forma geral, ambos os sistemas se mostram como alternativas
117 promissoras na área de cosméticos e na veiculação de vitaminas já que são obtidos a partir de
118 lipídios fisiológicos e biodegradáveis exibindo baixa toxicidade, o que significa excelente tolerância
119 (PARDEIKE *et al.*, 2010).

120 Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi preparar e caracterizar uma formulação
121 contendo acetato de retinol incorporada em um sistema nanoestruturado dos tipos CLN e NLS, além
122 de avaliar o perfil de liberação *in vitro* do ativo para prevenção do foto envelhecimento cutâneo.

123

124 2. Material e Métodos

125

126 2.1. Materiais

127 Metanol (grau – HPLC; PANREAC[®]); água ultrapura (milli-q); álcool etílico absoluto
128 (ALPHATEC); Cera de Abelha (GM CERAS); *Phospholipon 80H*[®] (LIPOID); Retinyl acetate[®]
129 (SIGMA); *Tween 80*[®] (VETEC); Squalene[®] (SIGMA-ALDRICH).

130

131 2.2. Preparação da formulação

132 As NL foram obtidas através do método de difusão de solvente em fase aquosa, utilizando
133 cera de abelha como lipídio sólido para as NLS e Squalene[®] incorporado a esta matriz lipídica para
134 os CLN. Inicialmente, a fase lipídica adicionada a Phospholipon 80H foi fundida a 70°C, em
135 seguida a fase orgânica composta de acetato de retinol(exceto nas NL inertes) em Etanol foi vertida
136 na fase lipídica. A esta fase orgânica resultante, é vertida a fase aquosa, composta de água e Tween
137 80, aquecida a 5°C acima da temperatura de fusão do lipídio sólido e a emulsão formada submetida
138 à homogeneização em Ultra-turrax (IKA[®] T25, 13000 rpm) por 1 minuto, e imediatamente levada
139 ao sonicador (35 Hz) (VIBRACELL[®] CV18) por 5 minutos. A amostra foi resfriada em banho de
140 gelo até atingir a temperatura de 5°C. Em seguida, a formulação preparada foi levada à agitação
141 magnética por 24 horas em temperatura ambiente para a evaporação do solvente.

142 Foram preparadas NLS com variação nas concentrações de Phospholipon 80H : Tween 80.
143 Para determinar a melhor proporção de tensoativos a ser utilizado, foram realizadas as técnicas de
144 tamanho de partícula, IPD e PZ e os resultados analisados.

145 A tabela 1 mostra a concentração dos componentes utilizados para o preparo dos CLN e
146 NLS.

Composição				
	CLN 1	CLN 2	NLS 1	NLS2
Retinyl acetate ® (µg)	-	0,01	-	0,01
Cera de abelha (%)	0,28	0,28	0,4	0,4
Squalene ® (%)	0,12	0,12	-	-
Tween 80 (%)	1	1	1	1
Phospolipon 80H (%)	0,25	0,25	0,25	0,25
Etanol* (%)	30	30	30	30
Água (%)	98,25	98,35	98,15	98,35

147 **Tabela 1.** Composição e porcentagem dos componentes utilizados na obtenção das CLN e NLS.

148 *Durante o processo de preparação das formulações, o etanol é evaporado.

149

150 2.3. Tamanho médio de partícula, Índice de Polidispersividade e Potencial Zeta

151 O tamanho das partículas, índice de polidispersividade (IPD), através do método de
152 espectroscopia de correlação de fóton, e o potencial zeta (PZ), pelo método de mobilidade
153 eletroforética, ambos foram determinados utilizando um Zetasizer Nano ZS (MALVERN
154 INSTRUMENTS®, UK). As análises foram realizadas em triplicata e as amostras foram diluídas em
155 água Milli-Q na proporção de 1:20(v/v).

156

157 2.4. Eficiência de Encapsulação

158 A determinação da eficiência de encapsulação (EE) foi realizada pelo método indireto, onde
159 é quantificado o ativo não encapsulado. A dispersões de nanopartículas foram centrifugadas (25°C,
160 10000 rpm, 90 min) usando tubos de ultra filtração (Ultrafree, VIVASPIN® 500, MWCO
161 10,000 Da) e o sobrenadante de cada amostra foi coletado e analisado por Cromatografia Líquida de

162 Alta Eficiência (CLAE). As análises foram realizadas em triplicata e a EE foi calculada de acordo
163 com a equação abaixo (Almeida *et al.*, 2012):

$$EE = \frac{m1 - m2}{m1} * 100 \quad (1)$$

165

166

167 Onde: EE: Eficiência de encapsulação; m1 = quantidade inicial de acetato de retinol utilizado no
168 preparo da formulação; m2 = quantidade de acetato de retinol presente na formulação
169 (sobrenadante).

170

171 2.5. Determinação da solubilidade

172 A determinação da solubilidade foi realizada em quatro sistemas solventes, a fim de definir
173 o melhor meio a ser utilizado no estudo de liberação *in vitro*, e desta forma, manter as condições
174 *Sink*. Para isto, excesso de ativo foi adicionado aos sistemas solventes e deixados sob agitação
175 magnética por 24h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas, os sobrenadantes foram filtrados
176 e diluídos apropriadamente antes da quantificação por CLAE-UV.

177

178 2.6. Estudo de liberação *in vitro*

179

180 2.6.1. Preparação das formulações de NL e controle

181

182 NL foram incorporados em gel de hidroxietilcelulose para facilitar a adesão da formulação
183 sob as células de difusão. Para isso, as dispersões de NL foram aquecidas, abaixo do ponto de fusão

184 do lipídio e foi acrescentado hidroxietilcelulose, após aquecimento para formar um gel a 0,4%
185 (m/V).

186

187 2.6.2. Cinética de liberação *in vitro*

188

189 Os estudos de liberação *in vitro* foram realizados utilizando células de difusão tipo *Franz*
190 com área de difusão de 1,77 cm² e volume do compartimento do meio receptor de 14 mL.
191 Membranas hidrofílicas de diálise foram fixadas na extremidade de cada célula (n = 5) e sobre elas
192 foram colocadas 400 µL de dispersão de NL ou controle, e o compartimento receptor foi preenchido
193 com uma solução de tampão fosfato pH 7,4 : etanol (1:1, v/v) , a qual foi mantida em temperatura
194 de 37 ± 0,5 °C sob agitação magnética constante por 8 horas. Para avaliar o perfil de liberação,
195 alíquotas (1 mL) do meio receptor foram coletadas nos intervalos de tempo de 0,5; 1; 2; 4; 6 e 8
196 horas, sendo realizada a reposição do meio receptor após cada coleta. As amostras coletadas foram
197 filtradas em filtros de membrana PTFE de 0,20 µm e analisadas por CLAE-UV para a quantificação
198 do acetato de retinol liberado em cada tempo.

199

200 2.7. Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

201 As análises por CLAE foram realizadas em um cromatógrafo líquido HPLC Shimadzu
202 UFLC Série LC-20AD®. A separação cromatográfica foi realizada em modo isocrático de eluição
203 utilizando uma metodologia validada previamente, onde a linearidade foi alcançada entre as
204 concentrações de 1µg/mL e 10 µg/mL apresentando coeficiente de correlação linear (r) 0,999, valor
205 considerado adequado para análise (Anvisa, 2003). Parâmetros tais como precisão, exatidão foram
206 avaliados obtendo-se CV < 5% e exatidão entre 96% e 105% considerados também adequados para
207 um método analítico de quantificação (Anvisa, 2003). A coluna utilizada foi a Phenomenex®
208 Gemini 5u C18 110 A de 25cm de comprimento, na temperatura de 35 °C. A fase móvel foi
209 constituída por uma mistura de metanol e uma solução aquosa ácido acético a 1% na proporção de

210 90:10 (v / v), respectivamente. A taxa de fluxo da fase móvel foi de 1,4 mL/min e foi realizada no
211 comprimento de onda de absorção de 320 nm. O tempo de retenção do ativo foi de
212 aproximadamente 12 min.

213

214 3. Resultados e Discussão

215

216 3.1. Análise macroscópica, tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta

217 **Tabela 2 .** Variação da concentração de Phospholipon 80H na pré formulação.

Phospholipon: Tween 80	Tamanho de partícula (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
1: 1	352,63 ± 2,19	0,201 ± 0,013	-30,57 ± 0,70
0,5: 1	263,16 ± 3,95	0,552 ± 0,015	-29,8 ± 1,21
0,25:1	231,56 ± 1,60	0,383 ± 0,011	-30,4 ± 0,72

218

219 A tabela 2 mostra a variação da proporção de Phospholipon 80H e Tween 80 na etapa inicial
220 de obtenção da formulação.

221 A proporção do Phospholipon selecionada para a preparação das dispersões de
222 nanopartículas foi de 0,25:1, pois apresentou o melhor tamanho de partícula, além de valores de
223 PDI e PZ adequados.

224 A partir da proporção tensoativo selecionada foram preparadas CLN e NLS com e sem
225 acetato de retinol utilizando a proporção de tensoativos selecionada na etapa anterior. Os resultados
226 de tamanho, IPD e PZ estão apresentados na Tabela 3 (página 11).

227 Nanopartículas são definidas como sendo partículas que possuem tamanho compreendido na
228 faixa entre 10 – 1000 nm (RAO; GECKELER, 2011). Como observado na tabela 3, todas as
229 amostras apresentaram tamanho nanométrico entre 143 e 774 nm. Foi observado também que a

incorporação do ativo promoveu aumento no tamanho das partículas. Este resultado foi mais evidente nas NLS, onde a incorporação de acetato de retinol resultou em partículas bem maiores (774 nm).

233

Tabela 3. Resultados de tamanho de partícula, IPD, PZ e eficiência de encapsulação das NLS e CLN obtidas (n=3).

Amostra	Tamanho de partícula (nm)	IPD	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de encapsulação (%)
CLN 1	143,3 ± 1,04	0,180 ± 0,003	-22,27 ± 0,51	-
CLN 2	163,4 ± 0,51	0,249 ± 0,007	-39,8 ± 1,35	99,95
NLS 1	212,6 ± 10,9	0,340 ± 0,051	-26,93 ± 1,56	-
NLS 2	773,5 ± 2,19	0,298 ± 0,002	-12,93 ± 0,23	100

236

De acordo com os dados apresentados na tabela 3, observa-se que todas as formulações obtiveram valores de IPD abaixo de 0,5. Este índice sinaliza a dispersão das partículas na formulação onde em valores abaixo de 0,5 indica uma menor tendência a aglomeração (GARG; SINGH, 2011).

Todas as amostras apresentaram também valor de PZ adequado, próximo a |25| mV, o que é satisfatório, já que um elevado PZ é indicativo de uma boa estabilidade física das formulações (DAS *et al.*, 2012). O PZ indica o potencial elétrico presente na superfície da partícula. Valores acima de |25|mV geram uma repulsão elétrica entre as partículas, dificultando a aglomeração entre as mesmas melhorando assim a estabilidade física do sistema (SINGH; LILLARD Jr, 2009; DAS *et al.*, 2012; HAN *et al.*, 2008; MARCATO, 2009; MEHNERT; MÄDER, 2012).

247 Comparando os resultados obtidos para as NLS e para os CLN, pode-se observar que os
248 CLN apresentaram menor tamanho, melhor IPD e maior PZ que as NLS.

249

250 3.2. Eficiência de encapsulação

251 A EE é um parâmetro quantitativo utilizado para calcular a quantidade de fármaco
252 incorporado na formulação. A EE foi calculada usando a equação 1 (Ítem 2.3). De acordo com a
253 tabela 3, pode ser observado que uma alta eficiência de encapsulação foi obtida, de acordo com o
254 método quantitativo utilizado. Esse resultado foi devido provavelmente a baixa afinidade do ativo
255 pelo meio hidrofílico, impedindo sua migração para o meio externo da formulação.

256

257 3.3. Solubilidade

258 Os resultados de estudo de solubilidade estão apresentados na Tabela 4. Os sistemas de
259 solvente que apresentaram melhores resultados foram os C e D, porém o emprego destes sistemas
260 nos ensaios de liberação *in vitro* não foi adequado. A presença do Tween 80 promoveu grande
261 formação de espuma dificultando o contato do meio receptor com a membrana (dados não
262 mostrados) e gerando dados não reprodutíveis. Por isso o meio escolhido para realizar o estudo de
263 liberação *in vitro* foi o sistema A.

264

265 **Tabela 4:** Solubilidade do acetato de retinol em diferentes sistemas solventes

	Tampão fosfato ph 7,4 (%)	Etanol (%)	Tween 80 (%)	Concentração (µg/mL)
A	50	50	-	143,0733 ± 21,38
B	70	30	-	- *
C	50	49	1	1595,737 ± 67,36
D	70	29	1	1369,38 ± 15,72

266 * Não foi detectado fármaco nessas amostras utilizando o método de análise proposto por CLAE-
267 UV

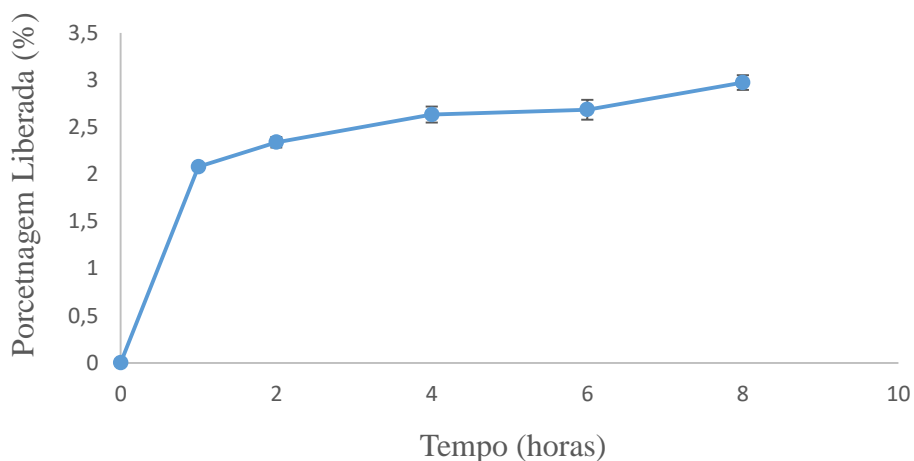
268

269 3.3. Estudos de liberação *in vitro* do Retinol

270 Devido aos resultados obtidos para as NLS nesse estudo, e as desvantagens inerentes a elas,
271 este sistema não foi selecionado para avaliação neste experimento. A liberação *in vitro* do acetato
272 de retinol incorporada nos CLN e formulação controle foi realizada em células de difusão do tipo
273 Franz utilizando membranas de diálise como barreira. O perfil de liberação do acetato de retinol foi
274 obtido com base na quantidade de fármaco liberado em função do tempo (Figura 1).

275

276 **Figura 1:** Perfil de liberação *in vitro* do Retinol em CLN. Os resultados foram expressos de acordo
277 com a média \pm desvio padrão (n= 5) das análises.



278

279 A formulação contendo o retinol manteve um perfil de liberação sustentado, como mostrado
280 na figura acima, após 1 hora de experimento o ativo começou a ser liberado, em 8 horas de
281 experimento foi liberado apenas 3% do retinol, que demonstra a dificuldade do ativo em ser
282 liberado dos CLN.

283

284 4. CONCLUSÃO

285

286 De acordo com os resultados apresentados, as NL obtidas através do método de difusão de
287 solvente em fase aquosa foram capazes de incorporar eficientemente o acetato de retinol. A
288 dispersão das NL exibiu tamanho nanométrico com aspecto homogêneo, sem a presença de
289 sedimentos. Os CLN apresentaram tamanho menor, melhor IPD e maior PZ que as NLS, além de
290 um perfil de liberação sustentado do acetato de retinol. Desta forma, CLN mostraram ser
291 formulações mais promissoras para a veiculação do ativo que as NLS. Além dos experimentos
292 realizados no nosso estudo, torna-se necessário realizar outros experimentos, tais como, estudo de
293 permeação *in vitro*, citotoxicidade, estabilidade e fotoestabilidade das NL, para garantir o potencial
294 da formulação para o tratamento do foto envelhecimento cutâneo.

295

296

297

298

299

300

301

302

303 5. REFERÊNCIAS

- 304 CLARES, B.;CALPENA, A.C.. Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid
305 nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: Effect on skin permeation. *International Journal of*
306 *Pharmaceutics* v.473, p591-598, 2014.
- 307 DATE A.A.; JOSHI M.D.; PATRAVALE V.B. Parasitic diseases: Liposomes and polymeric
308 nanoparticles versus lipid nanoparticles. *Advanced. Drug Delivery. Review.*, V. 59, p. 505-521,
309 2007.
- 310 HU FQ, Zhang Y, Du YZ, Yuan H. Nimodipine loaded lipid nanospheres prepared by solvent
311 diffusion method in a drug saturated aqueous system. *International Journal of Pharmaceutics*.
312 348: 146-152, 2008.
- 313 JENTZSCH, A.; AINKENS, P. RetiSTARTM for Cosmetic Formulations (Stabilized Retinol).
314 *Delivery System Handbook for Personal Care and Cosmetic Products* p.861-872, 2005.
- 315 KELLER, K.L.; FENSKE, N.A. Uses of vitamins A, C, and E and related compounds in
316 dermatology: A review. *Journal of the American Academy Dermatology* v. 39, p. 611-25, 1998.
- 317 MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and
318 applications. *Advanced Drug Delivery. Review.*, v.47, p.165-196, 2001.
- 319 MÜLLER, R. H.; LUCKS, J. S., 1996. Arzneistoffträger aus festen Lipidteilchen, Feste
320 Lipidnanosphären (SLN). *European Patent* 0 605 497
- 321 OLBRICH, C.; BAKOWSKY, U.; LEHR, C. M.; MÜLLER, R.H.; KNEUER, C. Cationic
322 solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA. *Journal of Controlled*
323 *Release*, v.77, p.345-355, 2001;
- 324 PHARM TTH, LOISEAU PM, BARRAT G. Strategies for the design of orally bioavailable
325 antileishmanial treatment. *International Journal of Pharmaceutics*. 454: 539-552, 2013.

326 PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MULLER, R.H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic
327 and pharmaceutical dermal products. International Journal of Pharmaceutics v.366, p.170-184,
328 2009.

329 PARDEIKE, J.; SCHWABE, K.; MULLER, R.H. Influence of nanostructured lipid carriers
330 (NLC) on the physical properties of the Cutanova Nanrepair Q10 cream and the in vivo skin
331 hydration effect. International Journal of Pharmaceutics v.396, p.166-173, 2010.

332 SOUTO EB, Wissing SA, Barbosa CM, Muller RH. Development of a controlled release
333 formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. International Journal of
334 Pharmaceutics. 278: 71-77, 2004.

335 SINGH,R.; LILLARD Jr. Nanoparticle-based targeted drug delivery.Experimental and
336 Molecular Pathology v.86, p215-223, 2009.

337 SCHÄFER, M.;MEHNERT, W.;KORTING, H. C. Lipid nanoparticles for improved topical
338 application of drugs for skin diseases. Advanced. Drug Delivery. Review. 59, 427–443, 2007.

339